

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ☒ 成果報告
☐ 期中進度報告

應用 SPME 方法配合蟹殼、幾丁質和幾丁聚醣來分析及處理奶品中的揮發性硫化物

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 94 — 2113 — M — 032 — 013 —

執行期間：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

計畫主持人：薛文發

共同主持人：

計畫參與人員：呂麗琪、洪東巽、莊德南

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☒ 精簡報告 ☐ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

☐ 赴國外出差或研習心得報告一份

☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告一份

☐ 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

☐ 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☒ 一年 ☐ 二年後可公開查詢

執行單位：淡江大學化學系

中 華 民 國 九 十 五 年 十 二 月 二 十 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

應用 SPME 方法配合蟹殼、幾丁質和幾丁聚醣來分析及處理奶品中的揮發性硫化物

計畫編號：NSC 94-2113-M-032-013

執行期間：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

計畫主持人：薛文發

一、中文摘要

本研究的目的是使用固相微量萃取(簡稱 SPME)配合蟹殼和甲殼質來分析及處理鮮奶中的揮發性的硫化物。一般生乳在從乳牛的乳房擠出的過程中，會受到微生物的污染，而使牛乳的風味、色澤、形態產生變化。因此，必須有殺菌的動作，來消除牛乳中對人體有害的菌類。

在目前市售牛乳的殺菌方法都是採用加熱處理方法，牛乳在熱處理時，也有揮發性硫化物的產生，而來源即是 β -乳球蛋白裂解而來。 β -乳球蛋白在 85°C 以上加熱時，會因為本身雙硫鍵的裂解，產生硫基游離，進而產生揮發性的硫化物，其中包括了包括硫化氫(H_2S)、甲硫醇(CH_3SH)、二甲基硫(DMS)、二甲基二硫(DMDS)和二甲基三硫(DMTS)等硫化物。這些硫化物不但是鮮乳不良風味的來源，也是環境的惡臭物質。所以本研究的第一目標是設計採樣鮮乳中的這五種具有揮發性含硫惡臭化合物的方法，即使用固相微萃取法(SPME)來採樣，並配合無火焰硫化學發光偵測器(Flameless SCD)測定。第二目標是，探討使用蟹殼和甲殼質作為吸附劑以去除鮮乳中含硫惡臭化合物的可能性。蟹殼中大約含有 30%的幾丁質(Chitin)，除外還有以碳酸鈣為主要成分的無機鹽，蛋

白質和脂質。幾丁質經去乙酰基及形成幾丁聚醣(Chitosan)(如圖一所示)，幾丁質和幾丁聚醣為生物高分子，合稱甲殼質，而蟹殼為水產廢棄物。蟹殼具多孔性，也具有螯合性。究的主要內容是使用固相微萃取法(Solid phase microextraction，簡稱 SPME)配合氣體層析儀-硫化學發光偵測器(GC/Flameless SCD)來測定乳品中含硫化合物。生乳及其加工過程均會有硫化物產生，而此硫化物是產生不良風味的來源。研究的目的是探討乳品中含有那些硫化物(包括硫化氫、甲硫醇、二甲基硫、二甲基二硫和二甲基三硫)，並做半定量分析(即比較各硫化物波峰的總面積)。

關鍵詞：鮮乳；含硫化合物；固相微萃取法；頂空分析；蟹殼；幾丁質；幾丁聚醣；吸附劑

Abstract :

The aims of this research is to develop a method for analyzing and treatment of volatile sulfur compounds in pasteurized milk by solid-phase microextraction (SPME) combine with crab shell powders, chitin and chitosan as

an adsorbent. To improve the knowledge of compounds responsible for milk flavor, the volatile fraction has been widely studied by several authors by applying different extraction techniques. Volatile compounds were found to be modified both by the technological heat treatment adopted for the production of drinking milk and during its shelf life. There appears to be some consensus that heated milk off-flavor is caused by an increase in the concentration of sulfur compounds. These include H_2S , methanethiol ($MeSH$), dimethyl sulfide (DMS), dimethyl disulfide, and dimethyl trisulfide. Based on threshold values from the literature, $MeSH$, DMS , and H_2S are likely to contribute to cooked milk flavor, and $MeSH$, DMS , H_2S , dimethyl disulfide are in heated milk; $MeSH$ and dimethyl disulfide were present in only trace amounts. Of these sulfur gaseous compounds are known to cause nuisance odors in the environment.

This research programs has two. First, to investigate the ability of solid phase microextraction (SPME), a more rapid, less expensive and less influenced by presence of artifacts technique, to determine the five volatile sulfur compounds in the pasteurized milk. With SPME, the analytes are absorbed from the gaseous sample onto an adsorbent-coated fused silica fiber, which is part of the syringe needle, for a fixed time. The fiber is then inserted directly into a GC injection port for thermal desorption. The gas chromatograph is equipped with flameless sulfur chemiluminescence detector for analysis. Secondly, using the crab shell powders, chitin and chitosan as an adsorbent for eliminating the sulfur compounds in the pasteurized milk. Crab shell powders contain 30% of chitin, which is a homopolymer of

N-acetyl- β -D-glucosamine, chitin has a structure basically similar to that of cellulose, except that the hydroxyl on carbon 2 of each residue is replaced by an acetylated amino group, and chitosan is a polymer of glucosamine.

Keywords : Pasteurized milk ; Sulfur compounds ; Solid phase microextraction ; Headspace analysis ; Crab shell powders ; Chitin ; Chitosan ; Adsorbent.

二、 研究目的

近年來，隨著生活水平的提高，人們開始注重飲食的營養與保健，表現之一就是乳製品消費量的開始增加，因為牛乳及乳品一直是被營養家、食品學家等認為含有廣泛養分之人類重要食物。牛乳為富有營養份之液體，亦為微生物之理想培養基，故細菌易於牛乳中孳長，又偶會混入病原菌而成為傳播疾病之媒體，且鑒於牛乳市場的迅速發展及實際需要，我們對於其加工技術、生產技術和管理方法也更有所要求。因此，供為飲用之牛乳都必須經過殺菌或滅菌，才能保證飲用者的衛生安全。一般牛乳之殺菌或滅菌，以加熱方法最為普遍。雖然還有利用超音波、放射線、紫外線、電力、離心力等物理方法，以及利用過氧化氫或添加抗生素等化學方法，但用於牛乳的效果仍停留於研究階段，所以目前僅有加熱一途。

在目前市售牛乳的殺菌方法，都採用巴氏殺菌法 (pasteurization)。巴氏殺菌的目的首要是殺死引起人類疾病的所有微生物。但除了致病微生物以外，牛乳中還含有能影響產品味道和保存期的其他成份和微生物，因此，巴氏殺菌的第二個目的是盡可能也破壞這些微生物和酶類系統，以保證產品質量。巴氏殺菌法雖然能有效將牛乳中有害的微生物去除，但牛乳是一種熱敏性物質，因此

在熱處理過程中，會造成牛乳的變質。乳蛋白質是在牛乳的熱處理中變化最複雜的，在食品化學中，揮發性的硫化物對於食品的風味有相當的影響，因為硫化物通常有獨特的氣味，且在低濃度即能被察覺。牛乳在熱處理時，也有揮發性硫化物的產生，而來源即是 β -乳球蛋白裂解而來。 β -乳球蛋白在 30°C 以下的牛乳中是以二聚體的形態存在的，在 30°C 以上則解離成單體的形態。在 65°C 以上加熱時，由於凝聚而使相對分子量增大，進而在 85°C 以上加熱時，-S-S-鍵裂解，產生硫基游離，甚至產生揮發性的硫化物和硫化氫，其產生的硫化物包括硫化氫、甲硫醇、二甲基硫、二甲基二硫和二甲基三硫，這些硫化物即會造成所謂的加熱臭，也是環境的惡臭物質。一般要偵測食品中硫化物並不是件易事，根據國外所發表的文獻，分析高溫殺菌牛乳中的硫化物都是採用 Purge and Trap 的方法，而氣體層析儀的偵測器是使用 FPD，而本研究計劃所提的新方法是使用固相微量萃取法 (SPME) 來採樣牛乳中這些揮發性硫化物並配合氣體層析儀使用無火焰硫化學發光偵測器 (Flameless SCD) 來分析。除外，也將探討使用蟹殼和幾丁聚醣去除牛乳中的這些硫化物的可能性。目前在國內還未能建立起一套分析牛奶中硫化物的方法。我們希望這個分析方法能成功，也可應用到其他液體樣品的分析。

SPME 微量萃取法於 1990 年由加拿大 Janusz Pawliszyn 教授發展成功，這是一種簡單 (simple) 和不花很多錢的樣品萃取法，而且對微量有機化合物可以獲得非常低量的偵測。SPME 萃取法不使用有機溶劑，而可以從液體和固體樣品之中，萃取和濃縮揮發性和半揮發性的有機化合物。SPME 目前在國際上的應用頗廣，包括食品、香氣、藥學、臨床醫藥和環保等領域。SPME 的萃取法有三種方式，即直接萃取法 (direct extraction)，頂空萃取法 (headspace extraction) 和薄膜保護萃取法 (membrane-protected SPME) (如圖二所

示)。

幾丁聚醣為生物高分子，其化學式為 $(C_6H_{11}NO_4)_n$ ($n=1000\sim3000$)，它的構造式類似纖維素 (幾丁聚醣的分子結構如圖一所示)。螃蟹的甲殼，大約含有 30% 的幾丁質，蟹殼經過去鈣、去蛋白質和去色素的處理，即可成幾丁質。而幾丁質再經去乙酰基的步驟，即成幾丁聚醣。在過去蟹殼是屬於廢棄污染物，目前將這種廢棄物再生成有價值的產物，可說是一舉數得。幾丁質和幾丁聚醣已商品化，目前國內已能從蝦蟹殼自己萃取製造，所以這也是一項生物技術的新產品。國內有關於幾丁質和幾丁聚醣的應用，著重在醫藥領域、保健食品、食品加工、農業領域和化妝品業。而本實驗室則致力於環保和作為吸附劑的應用。根據我們使用掃描式電子顯微鏡 (SEM) 照相分析，蟹殼、幾丁質和幾丁聚醣都具有多孔性，因此也具有吸附性質。

三、研究方法

(一) 儀器與藥品

1. 氣體層析儀 (GC): HP-5890 (Series II) 型，附無火焰硫化學發光偵測器 (Flameless SCD)。
2. 固相微萃取纖維針 (SPME Fiber): 100 μ m film thickness PDMS (Polydimethylsiloxane)
3. 幾丁聚醣 (Chitosan): 50-100 mesh，台灣凱得生科技股份有限公司提供。
4. 硫化物標準品：
 H_2S (0.45ppm) 氣體標準品 (PraxAir)、
 CH_3SH 、 $(CH_3)_2S$ 、 $(CH_3)_2S_2$ 、 $(CH_3)_2S_3$
液體標準品

(二) GC 操作條件

Column: GC-GasPro (30m \times 0.32mm i.d.; J&W Scientific, Folsom, CA).
Injection Port 溫度: 250°C.
Oven 溫度: 80°C $\xrightarrow{8^\circ C/min}$ 250°C.
Carrier Gas: He, 1mL/min.

(三) SPME 採樣乳品中硫化物

取 18ml 的乳品置於樣品瓶中，並以 SPME 纖維針 (fiber) 進行頂空採樣 (headspace extraction) 35 分鐘。進行採樣時，乳品需攪拌並加熱至 70~75℃。將採樣完的 SPME 纖維針插入氣相層析儀的注射埠進行熱脫附，脫附時間為 4 分鐘，脫附溫度為 250℃，並進行氣體層析儀分析。

四、結果與討論

(1) 五種硫化物標準品的鑑定與滯留時間

圖三、圖四為五種硫化物標準品的層析圖。五種硫化物分別為硫化氫(H_2S)、甲硫醇(CH_3SH)、二甲基二硫($(CH_3)_2S_2$)、二甲基三硫($(CH_3)_2S_3$) (參考圖三) 和二甲基硫($(CH_3)_2S$) (參考圖四); 表一為五種硫化物的滯留時間。

(2) 市售不同廠牌奶粉樣品之探討

圖五~圖七為分析管柱的空白測試及萃取不同乳品所得的硫化物層析圖。圖五(A) 為管柱之空白測試，其餘各層析圖(圖五(B)~圖七)的波峰分別為 1：硫化氫、2：甲硫醇、3：二甲基二硫和 4：二甲基三硫。

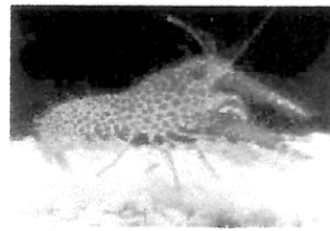
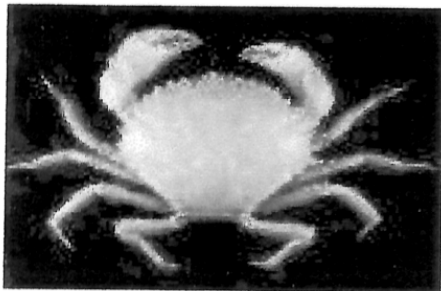
在台灣市售的牛奶樣品中並無偵測到二甲基硫。市售乳品中的硫化物主要含有硫化氫、甲硫醇、二甲基二硫、二甲基三硫，其中又以硫化氫的含量最多。

五、參考資料

1. Sye, W.F.; Chen, Y.C. and Tai, J.W. *J. Chin. Chem. Soc.* 2004, 51, 675-680.
2. Contarini, G. and Povolo, M. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 7350-7355.
3. Simon, M.; Hansen, A.-P.; Young, C.-T. *J. Dairy Sci.* 2001, 84, 774-783.
4. Simon, M. and Hansen, A.-P. *J. Dairy Sci.* 2001, 84, 784-791.

5. Gerbersmann, C.; Lobinski, R. and Adams, F. C. *Analytica Chimica Acta*, 316 (1995) 93-104.
6. Li, H. P.; Li, G. C. and Jen, J. F. *J. of Chromatogr. A.* 1012 (2003) 129-137
7. Cai, L.; Xing, J.; Dong, L. and Wu, C. *J. of chromatogr. A.* 1015 (2003) 11-21
8. Goncalves, C. and Alpendurada, M. F. *J. of Chromatogr. A.* 968 (2002) 177-190
9. 幾丁質幾丁聚醣生物科技應用研討會論文集, (2002) .
10. 幾丁質幾丁聚醣研討會論文集, (2001) .
11. Sye, W.F. and Chen, W.Y. *Toxicol. Environ. Chem.*, 77 (2000) 207-218.
12. Pawliszyn, J. *Applications of Solid Phase Microextraction: Royal Society of Chemistry*; Cambridge, (1999) .
13. Vazquez-Landaverde, P.-A.; Torres, J.-A.; Qian, M.-C. *J. Dairy Sci.* **2006**, 89, 2919-2927.
14. Vazquez-Landaverde, P.-A.; Velazquez, G.; Torres, J.-A.; Qian, M.-C. *J. Dairy Sci.* **2005**, 88, 3764-3772.

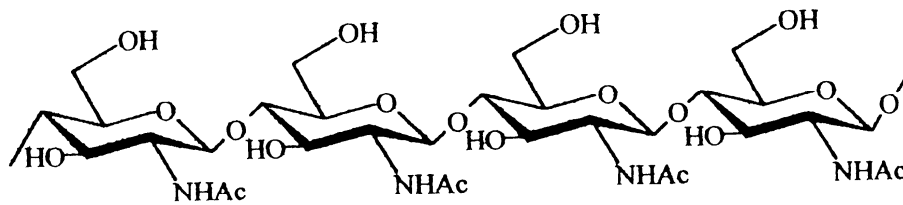
六、圖與表



1. 去鈣(加稀硫酸)
2. 去蛋白質(加稀 NaOH 溶液)
3. 去色素

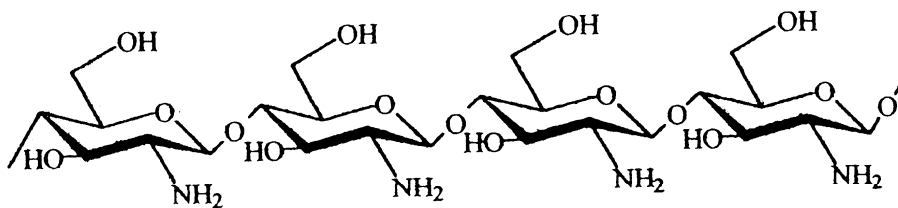


幾丁質(Chitin)



去乙酰基(加濃 NaOH 溶液)

幾丁聚醣(Chitosan)



圖一、幾丁質和幾丁聚醣的分子結構

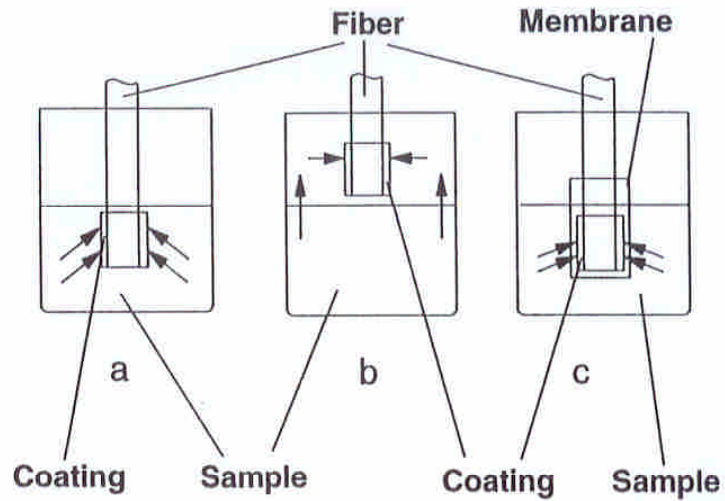


Figure Modes of SPME operation: (a) direct extraction, (b) headspace SPME, (c) membrane-protected SPME.

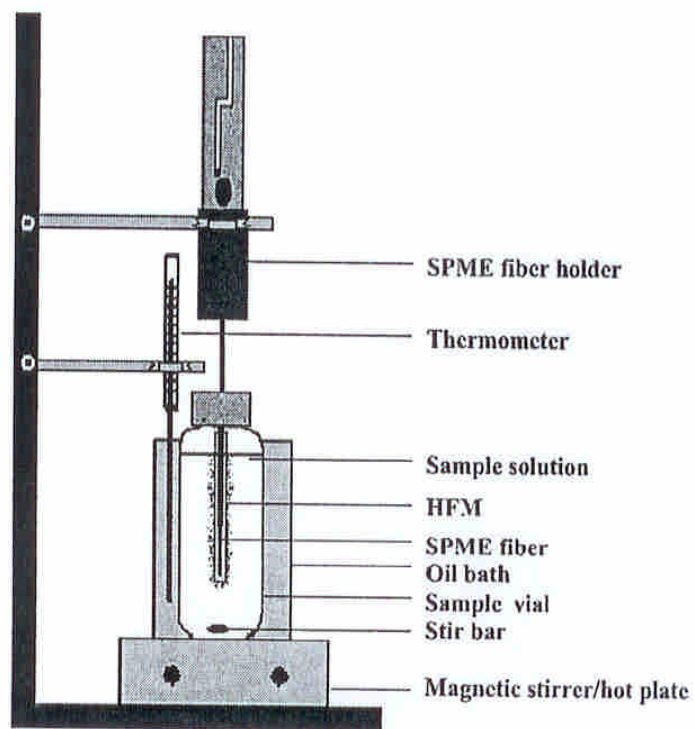
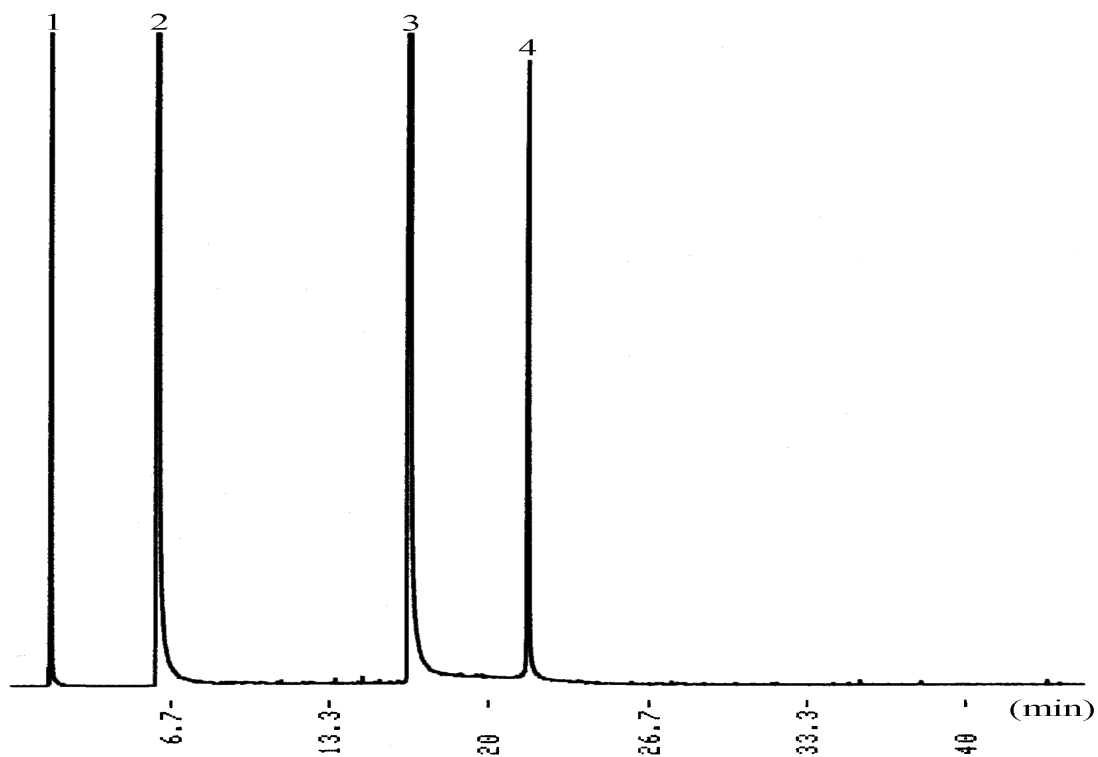
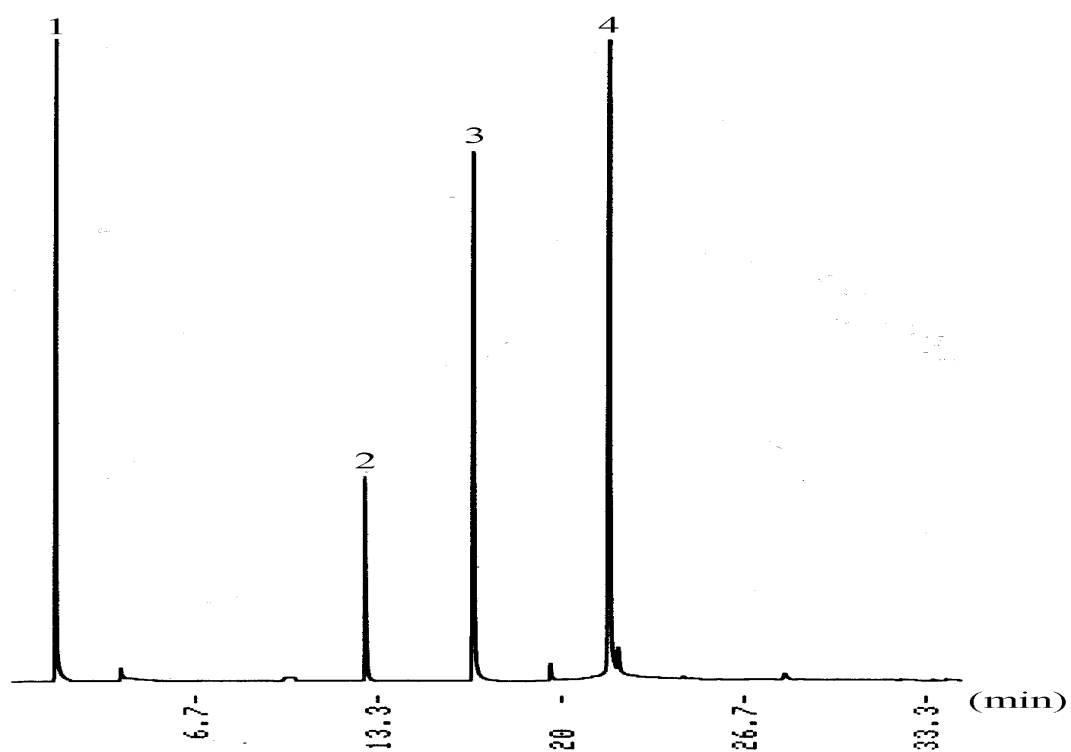


Fig. Schematic of HFM-SPME.

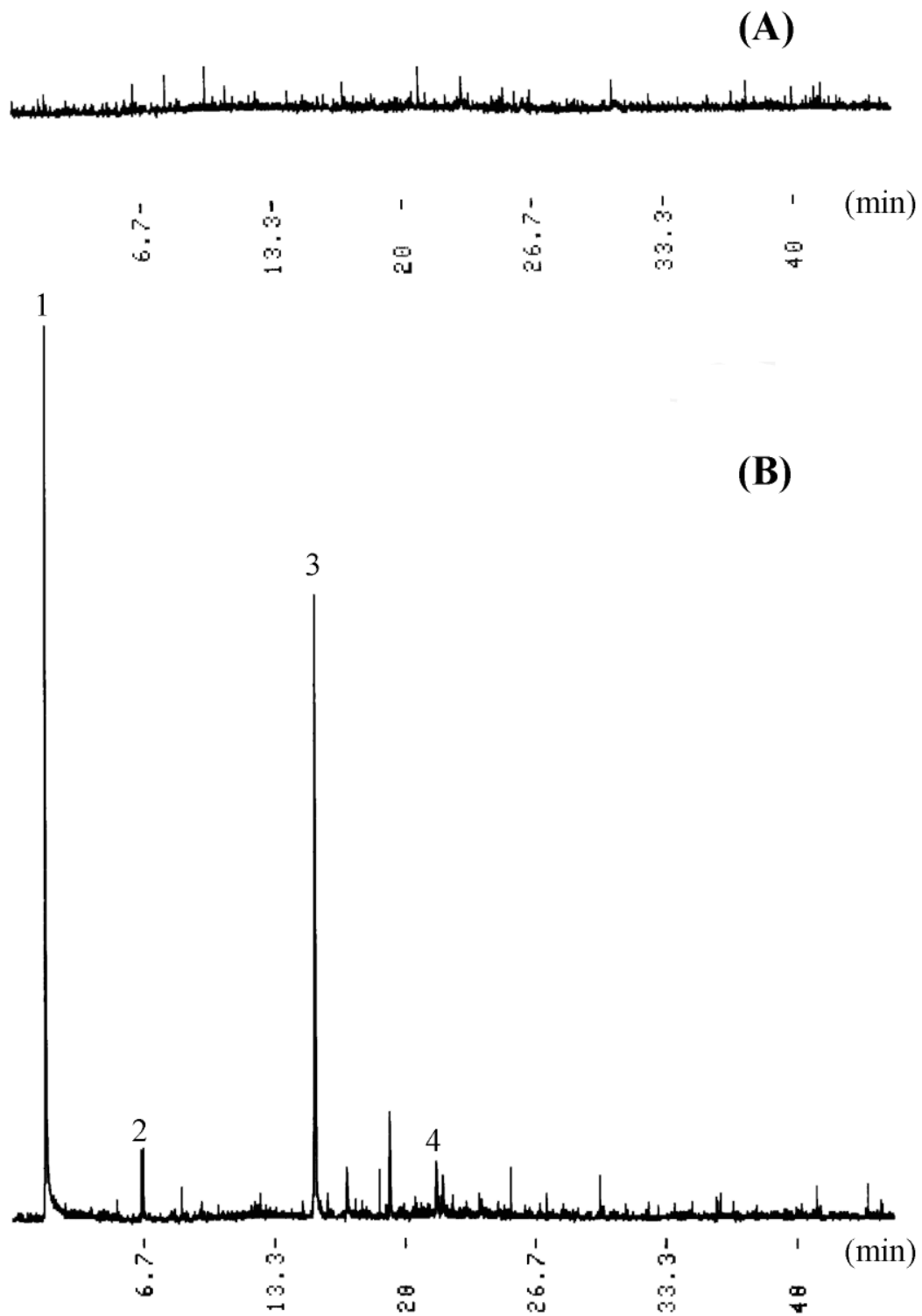
圖二、SPME 的頂空、直接浸入和薄膜保護的三種萃取方法的圖



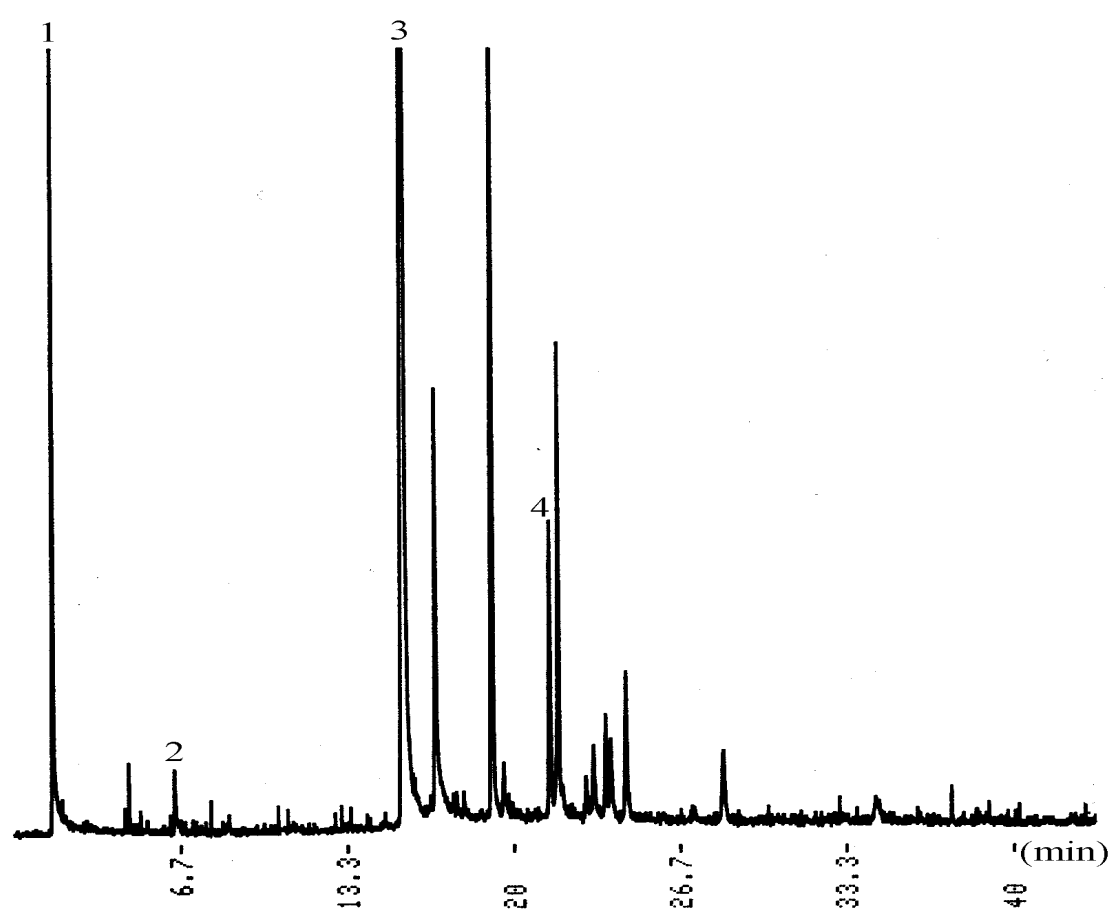
圖三、四種硫化物標準品的層析圖。硫化氫(1)、甲硫醇(2)、二甲基二硫(3)、二甲基三硫(4)



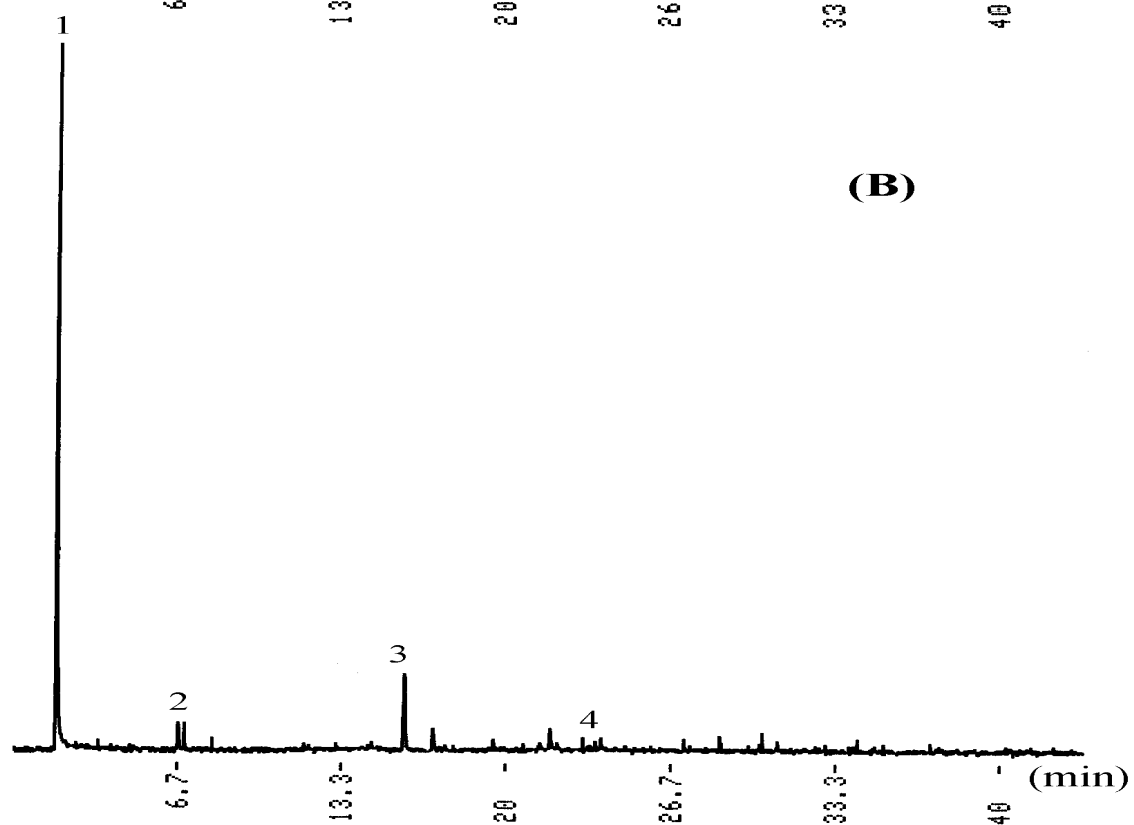
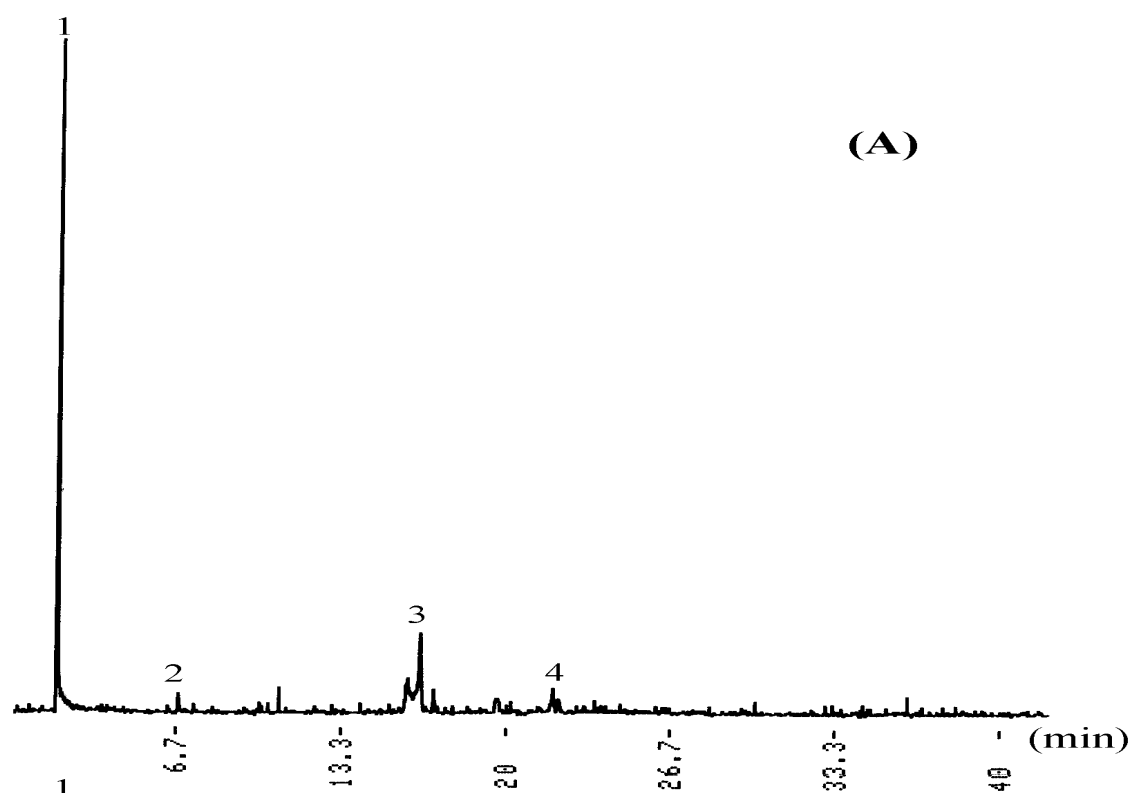
圖四、四種硫化物標準品的層析圖。硫化氫(1)、二甲基硫(2)、二甲基二硫(3)、二甲基三硫(4)



圖五、為萃取市售乳品之層析圖：(A)分析管柱的空白測試 (B)樣品 1,硫化氫
(1)、甲硫醇(2)、二甲基二硫(3)、二甲基三硫(4)



圖六、市售乳品樣品 2,其中各波峰編號的硫化物如圖五所示



圖七、比較不同廠牌的市售乳品(A)樣品 3 (B)樣品 4,其中各波峰編號的硫化物如圖三所示

表一、五種硫化物的滯留時間

硫化物	滯留時間(分鐘)
硫化氫 (H_2S)	1.64
甲硫醇 (CH_3SH)	6.07
二甲基硫 (DMS)	12.88
二甲基二硫 (DMDS)	16.70
二甲基三硫 (DMTS)	21.66